The influence of cultivation conditions of promising *Bacillus subtilis* strains on their ability to produce antifungal metabolites

Sidorova T.M., Asaturova A.M., Khomyak A.I.

FSBSI All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection, Krasnodar, Russia

E-mail: 0166505@mail.ru

Key message. Antifungal compounds, including surfactin and iturin A, are accumulated by *B. subtilis* BZR336g strain at the cultivation temperature of 20.0-25.0 °C and the nutrient medium acidity pH8.0, for *B. subtilis* BZR517 strain these parameters are 30.0-35.0 °C and pH8.0-10.0, respectively.

Keywords: antifungal compounds, iturin A, surfactin, chromatography, bioautography

The production of antifungal compounds is the basis of the strategy for the phytopathogenic fungi control with *B. subtilis* bacteria, among which cyclic lipopeptides (surfactins, iturins, fengicins) have been studied to a greater extent (Caulier et al., 2019). Variants and ratios of synthesized lipopeptides depend not only on the strain, but also largely on the conditions of cultivation of the bacterium.

Aim. The study of the optimal cultivation parameters of *B. subtilis* BZR336g and *B. subtilis* BZR517 strains that contribute to the maximum production of antifungal metabolites.

Isolation and analysis of synthesized by *B. subtilis* BZR336g and BZR517 strains (bioresource collection of the FSBSI VNIIBZR «State collection of entomocarcinogens and microorganisms») as well as commercial (surfactin, iturin A produces by Sigma-Aldrich) lipopeptides were performed using the method of upward thin-layer chromatography (Merck kieselgel plates (Germany), layer thickness 2 mm), mobile phase: ethyl acetate-ethanol-water (40:15:15). After analyzing the chromatograms under UV light at a wavelength of 366 nm, the plates were impregnated with a potato-glucose nutrient medium, then a suspension of propagules of test fungus (*F. oxysporum* var. *orthoceras*) was applied and placed in a humid chamber at a temperature of 28 °C for 48 h. The localization of active components was judged by the formation of zones of the test fungus growth inhibition (Sidorova et al., 2019).

When comparing the obtained lipopeptide profiles with commercial surfactin (Rf 0.76) and iturin A (Rf 0.28), we found that both strains produce both the first and the second lipopeptide, and *B. subtilis* BZR336g accumulates surfactin and iturin A more than *B. subtilis* BZR517 strain. The analysis of bioautograms of the synthesized metabolites allows us to state that surfactin and iturin A are best produced at a temperature of 20.0-25.0 °C for *B. subtilis* BZR336g strain and 30.0-35.0 °C for *B. subtilis* BZR517 strain. A bioautographic study of the culture fluids of the studied strains also showed that pH 8.0 is most optimal for the synthesis of surfactin and iturin A by *B. subtilis* BZR336g, and the acidity index is 8.0-10.0 for *B. subtilis* BZR517 strain.

The studies were carried out in accordance with State Assignment No. 075-00376-19-00 of the Ministry of science and higher education of the Russian Federation as part of research on the topic No. 0686-2019 0013.

Влияние условий культивирования перспективных штаммов *Bacillus subtilis* на их способность продуцировать антигрибные метаболиты

Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений, Краснодар, Россия

Аннотация. Антигрибные соединения, включая сурфактин и итурин А, накапливаются штаммом *B. subtilis* BZR336g при температуре культивирования 20,0-25,0°C и кислотности питательной среды pH8,0, для штамма *B. subtilis* BZR517 эти параметры 30,0-35,0°C и pH8,0-10,0, соответственно.

Ключевые слова. Антигрибные соединения, итурин А, сурфактин, хроматография, биоавтография

Актуальность. Производство противогрибных соединений является основой стратегии борьбы бактерий *B. subtilis* с фитопатогенными грибами, среди которых в большей степени изучены циклические липопептиды (сурфактины, итурины, фенгицины) (Caulier et al., 2019). Варианты и соотношения синтезируемых липопептидов зависят не только от штамма, но и в значительной степени от условий культивирования бактерий.

Цель. Изучение оптимальных параметров культивирования штаммов *B. subtilis* BZR336g и *B. subtilis* BZR517, способствующих максимальному продуцированию антигрибных метаболитов.

Методы. Выделение и анализ липопептидов, синтезируемых штаммами *B. subtilis* BZR336g и BZR517 (биоресурсная коллекция ФГБНУ ВНИИБЗР «Государственная коллекция энтомокарфагов и микроорганизмов»), а также коммерческих липопептидов (сурфактин, итурин А фирмы Sigma-Aldrich), проводили методом восходящей тонкослойной хроматографии (кисельгелевые пластины «Merck» (Германия), толщина слоя 2мм), подвижная фаза: этилацетат-этанол-вода (40:15:15). После анализа хроматограмм под УФ-светом (366нм) пластины пропитывали картофельно-глюкозной питательной средой, наносили суспензию пропагул тестового гриба (*F. oxysporum* var. *orthoceras*) и помещали во влажную камеру при температуре 28°C на 48ч. О локализации активных компонентов судили по формированию зон подавления роста тест - гриба (Сидорова с соавт., 2019).

При сравнении полученных липопептидных профилей с коммерческими сурфактином (Rf 0.76) и итурином А (Rf 0.28) обнаружено, что оба штамма продуцируют как первый, так и второй липопептид, причем штамм *B. subtilis* BZR336g накапливает сурфактин и итурин А в большей степени, чем штамм *B. subtilis* BZR517. Анализ биоавтограмм синтезируемых метаболитов позволяет констатировать, что в наибольшей степени сурфактин и итурин А продуцируются при температуре 20,0-25,0°C – для штамма *B. subtilis* BZR336g и 30,0-35,0°C – для штамма *B. subtilis* BZR517. Биоавтографическое исследование культуральных жидкостей изучаемых штаммов также показало, что для синтеза сурфактина и итурина А штаммом *B. subtilis* BZR336g наиболее оптимален pH 8,0, а для штамма *B. subtilis* BZR517 показатель кислотности 8,0-10,0.

Исследования выполнены согласно Государственному заданию № 075-00376-19-00 Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НИР по теме №0686-2019 0013.

1. Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. Front. Microbial., 2019, 10:302.
2. Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И., Томашевич Н.С. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus subtilis* 517 модифицированным методом биоавтографии. Сельскохозяйственная биология, 2019, том 54, № 1, с. 178-185.